

MikroRNS expresszió vizsgálata humán hepatoblastomában

Doktori tézisek

Gyugos Mónika

Semmelweis Egyetem
Patológiai Tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Schaff Zsuzsa, az MTA levelező tagja, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Törő Klára, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Horváth Gábor, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Fehér Erzsébet, Ph.D., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Sebestyén Anna, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Dr. Simon Károly, Ph.D., osztályvezető főorvos

Budapest
2014

BEVEZETÉS

Gyermekekori tumorokról 15 év alatti kor esetén beszélhetünk, melyek az összes daganatos megbetegedés 1%-át teszik ki. A primer rosszindulatú májdaganatok a gyerekekori tumoroknak kb. 1-4 %-a, ennek 90 %-a hepatoblastoma (HB), mely ezzel a leggyakoribb primer rosszindulatú gyerekekori májdaganat. Éves szinten 1 millió gyerek közül körülbelül 1,6-2 betegszik meg hepatoblastomában, Magyarországon évi 3-4 HB esetet regisztrálnak (Országos Gyermektumor Regiszter adatai alapján). A hepatoblastoma gyakran fejlődési rendellenességekkel asszociált tumor, mely magas alfa-fetoprotein (AFP), onkofetális marker expresszióval jellemezhető. Etiológiája máig csak részben tisztázott, ennek egyik lehetséges oka, hogy nagyon ritka betegségről van szó.

Más egyéb tumorok mellett, a hepatoblastoma patomechanizmusát sem sikerült még teljes egészében feltárni. A hepatoblastoma hepatikus progenitor sejtekből ered, amelyek különböző májfejlődési állapotokon mennek keresztül, erre utalnak a hepatoblastoma szövettani típusai. Jelentős különbség van a főként gyermekkorban kialakuló hepatoblastoma és a gyermekkort meghaladóan jelentkező hepatocellularis carcinoma (HCC) között, míg a HCC főként krónikus májbetegség (vírusfertőzés, cirrhosis, steatosis) talaján alakul ki, addig a hepatoblastoma létrejöttében sem vírus, sem cirrhotikus máj nem játszik szerepet, az okok inkább genetikai, epigenetikai eredetre vezethetőek vissza. A hepatoblastoma leggyakrabban 6 hónapos és 3 éves kor között (az átlag életkor 18 hónap) fordul elő. A HB kezdeti stádiumban nem okoz panaszokat, így egyéb okból végzett hasi ultrahang vizsgálaton a megnagyobbodott máj utalhat hepatoblastomára. A

HB azonosításában a legfontosabb szérumfehérje az AFP. A diagnózist ezen marker magas értékére, valamint radiológiai és hisztológiai vizsgálatok eredményeire alapozva állítják fel. A HB diagnosztikájában és osztályozásában a szövettani vizsgálat alapvető fontosságú. Ez részben azért fontos, hogy elkülöníthető legyen a HB és a gyerekkori HCC egymástól, másrészt pedig a különböző szövettani típusok eltérő prognózissal társulnak. A daganatot epitheliális, kevert, valamint nem osztályozható szövettani csoportokra oszthatjuk. Az epitheliális a leggyakoribb típus, mely az esetek 60%-ban fordul elő. Ezt a típust fetális, embrionális, makrotrabekuláris, kis sejtes differenciálatlan és kolangioblasztikus szubtypusokra oszthatjuk.

A mikroRNS-ek (miRNS, miR) rövid, 18-25 nukleotid hosszúságú, fehérjét nem kódoló RNS-ek, amelyek univerzálisan expresszálódnak a gerinces és gerinctelen állati, gomba és növényi szervezetek sejtjeiben. A mikroRNS-ek által szabályozott gének számos életműködésekkel kapcsolatos biológia folyamatot szabályoznak, mint például az egyedfejlődés pontos időbeli lefolyása, sejt differenciáció, proliferáció, apoptózis vagy a jelátviteli utak expressziója így szerepet játszanak betegségek, elsősorban daganatok kialakulásában és progressziójában. miRNS-ek diszregulációját humán betegségek széles körében leírták, mint például keringési rendellenességek, metabolikus zavarok, neurodegeneratív- és autoimmun betegségek. Felvetődött, hogy a jelentős mértékben megváltozott expressziójú miRNS-ek a tumorok diagnózisa és prognózisa szempontjából biomarkerként számításba jöhetnek, sőt mivel miRNS-ek kimutathatóak szérumból is, az expressziós szintjükben mért

változás diagnosztikus értékű lehet. A miRNS profil meghatározások alapján úgy tűnik, hogy mind az egészséges, mind a beteg szövetekre sajátos miRNS expressziós mintázat jellemző. Kevés adat áll rendelkezésre arról, hogy hogyan változik a mikroRNS-ek expressziós szintje hepatoblastomában, de néhány közleményben beszámoltak a miR expressziós szintek változásáról a környező szövethez, normál májhoz vagy HCC-hez képest, azonban a különböző HB szövettani típusok miR-expressziós profilját eddig még senki nem vizsgálta.

CÉLKITŰZÉSEK

Az irodalomban mindösszesen három munkacsoport vizsgálta a miRNS-ek expresszióját hepatoblastomában, illetve metasztatikus hepatoblastomában. Ezek alapján a következő célkitűzéseket fogalmaztuk meg:

1. A miR-17-5p, miR-18a, miR-21, miR-34a, miR-96, miR-122, miR-140, miR-181a, miR-195, miR-210, miR-214, miR-221, miR-222, miR-223 és miR-224 mikroRNS-ek expressziós szintjének meghatározása hepatoblastomában, kiemelten az epiteliális szövettani altípusokban.
2. A hepatoblastomában észlelt miRNS eltérések összevetése a betegek túlélési adataival.
3. A túléléssel összefüggést mutató miRNS-ek közös célgénjeinek *in silico* feltérképezése.
4. A miRNS expresszió és β -catenin-szint korrelációjának vizsgálata hepatoblastomában.

5. A hepatoblastomában mért miRNS expresszió összevetése HCC-ben észlelt eltérésekkel irodalmi adatok alapján

MÓDSZEREK

Betegadatok

A betegmintákat a Semmelweis Egyetem II.sz. Patológiai Intézetének valamint az I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetének archívumában 1995-2010 között megtalálható hepatoblastoma esetekből választottuk. A kiválasztott 20 beteg nem szerinti megoszlása 10 fiú és 10 lány, átlagéletkoruk 3,69 év.

Szövetminták

A paraffinba ágyazott blokkokból a szövettani értékeléshez 3-5 µm-es metszeteket készítettünk és hematoxin-eozinnal (HE) megfestettük. Az általunk vizsgált hepatoblastoma tumorok epitheliális típusúnak bizonyultak, 12 fetális és 8 embrionális típus megoszlásban. Az utóbbi csoportból 5 esetben csak embrionális területet, míg 3 esetben mind embrionális, mind fetális területet ki tudtunk jelölni a makrodisszekcióhoz, így összesen 15 fetális, 8 embrionális illetve 15 tumorkörnyéki nem tumoros májminta állt rendelkezésünkre.

mikroRNS expressziós szint meghatározás

A teljes RNS izolálást követően reverz transzkripciót és valós idejű PCR reakciót végeztünk TaqMan microRNA assay segítségével.

mikroRNS célgének keresése *in silico*

A túlélési analízisben szignifikánsnak talált miRNS-ek potenciális célgénjeinek feltérképezését a miRanda predikciós algoritmus alapján végeztük. A közös célgének által érintett jelátviteli útvonalak analízisét a WebGestalt rendszer segítségével végeztük a Benhamini-Hochberg módszer szerinti többszörös korrekciós teszt alapján. Az eredményt a $p < 0,01$ alatt fogadtuk el szignifikánsnak, a minimális génszám a Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes rendszerben 5-re lett beállítva.

Immunhisztokémia

Az *in silico* targetpredikció során meghatározott ZNF207 fehérje expressziójának kimutatására végzett immunreakciót formalin fixált paraffinba ágyazott blokkokból készített 3 μ m vastag metszeteken, a Novolink Polymer Detection System Kit (Leica Biosystems, Wetzlar, Németország) és ZNF207 ellenes antitest (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA) segítségével hajtottuk végre manuálisan.

Az immunreakciókat szemikvantitatív módon értékeltük a következők szerint: 10 random módon kiválasztott 400x nagyítású látótérben 100 sejtet

vizsgáltunk területenként. Az immunreakció értékének az intenzitás és a festődő sejtmagok százalékos arányának megfelelő pontérték szorzatát vettük és azt használtuk a statisztikai számításokhoz.

Statisztikai módszerek

A mintákban mért relatív expresszió statisztikai összehasonlításához nem-parametrikus tesztek alkalmaztunk (Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis ANOVA). A teljes túlélést (OS, overall survival) és az eseménymentes túlélést (EFS, event free survival) Kaplan-Meier módszerrel vizsgáltuk. A túlélési görbék összehasonlításához log-rank tesztet alkalmaztunk. Az immunhisztokémiai és relatív miRNS expressziós értékek korrelációját a szintén nem-parametrikus Spearman rangsor tesztel végeztük. A statisztikai számításokhoz a STATISTICA szoftver 9.1 verzióját használtuk és a kapott teszteredményeket akkor tekintettük szignifikánsnak ha $p < 0,05$ teljesült.

EREDMÉNYEK

1. A hepatoblastoma minták makroszkópiája és szövettani vizsgálata

A szövettani vizsgálat epitheliális hepatoblastoma tipikus hisztopatológiai képét mutatta az összes esetben. A fetális komponens kis, uniform, fetális hepatocitákra emlékeztető sejtekből állt eozinofil citoplazmával, kerek-ovális bazofil sejtmaggal. A sejtek néhol trabekulákba rendeződtek. Ezzel ellentétben az embrionális komponens sejtei kevésbé differenciálódtak, nagy sejtmaggal és kevés citoplazmával rendelkeztek, továbbá a sejtek pszeudorozettákat alkottak. A környező máj nem mutatott szignifikáns változást, néhol enyhe fibrózis illetve nem-specifikus gyulladás volt látható.

2. miRNS vizsgálatok

Amikor a hepatoblastoma tumoros mintákat a környező májjal hasonlítottuk össze, 6 miRNS mutatott szignifikáns különbséget: a miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210 és miR-214 relatív expressziója csökkent, míg a miR-221-szintje emelkedett a tumoros mintákban a környező májszövethez képest.

Amikor a fetális és embrionális hepatoblastoma szövettani típusokat vetettük össze a nem-tumoros környező májjal, a miR-17-5p, miR-195, miR-210 és miR-214 expressziója csökkent, míg a miR-221 szintje emelkedett a fetális mintákban. Ugyanakkor csökkent miR-122 expressziót

találtunk az embrionális mintákban a környező májszövethez képest. Az embrionális és fetális komponens között a miR-18 expressziós szintje szignifikánsan csökkent a fetális mintákban.

3. A túlélés és a miRNS expresszió összefüggése

Az OS szignifikánsan különbözött az alacsony és magas miR-21 ($p < 0,02$), a magas és alacsony miR-222 ($p < 0,03$), valamint a magas és alacsony miR-224 ($p < 0,01$) vonatkozásában. Magas miR-222, magas miR-224 és alacsony miR-21 rövidebb OS-sel társult; az átlagos túlélés 92,5, 57,6 és 55,6 hónap volt ebben a csoportban. Ezzel szemben az alacsony miR-222, alacsony miR-224 és magas miR-21 csoport átlagos túlélése 101,8; 132,8 és 144,5 hónapnak bizonyult. EFS tekintetében sem a recidívával, sem a metasztázissal összefüggésben szignifikáns különbséget nem kaptunk.

4. A miRNS célgének keresése *in silico*

A túléléssel szignifikáns összefüggést mutató miR-21, miR-222 és miR-224 célgénjeit és cél mRNS szekvenciáit a miRanda targetpredikciós algoritmus segítségével kerestük. A három miRNS közös metszeteként 203 célgént kaptunk, amelyek közül 198 rendelkezett „Entrez Gene” azonosítóval a KEGG rendszerben. A statisztikai számítások után 4 útvonal felelt meg a kritériumoknak (minimális génszám: 5, $p < 0,01$). Választásunk a MAPK útvonalra esett, mert irodalmi adatok arra utalnak, hogy a hepatoblastoma tumorbiológiája összefüggésben áll ezzel az útvonallal. A kapott célgének

betegmintákban történő expressziójának kiértékeléséhez microarray chip eredményeket kerestünk. A megtalált Affymetrix array-eken a 203 génből 149 szerepelt. Minden gén esetén a normális és nem tumoros minták közötti statisztikai vizsgálatot Student t-tesztel végeztük el. Eredményül a ZNF207-et kaptuk.

5. Immunhisztokémiai vizsgálatok

Az *in silico* célgén alapján elsőként rangsorolt ZNF207 fehérje expresszió vizsgálatának eredményeként azt kaptuk, hogy a ZNF207 a fetális májban gyenge/közepes, míg az embrionális szubtypusban erős reakciót adott. Szignifikáns különbség volt az embrionális és a környező máj között ($p < 0,008$), valamint a hepatoblastoma minták és környező máj között ($p < 0,03$). A túlélés statisztikai vizsgálata nem mutatott összefüggést az OS és ZNF207 expresszió között, ugyanakkor EFS, a recidíva függvényében, összefüggést mutatott a ZNF207 fehérje expressziójával, magas ZNF207 expresszió jobb EFS-sel társult ($p < 0,04$).

6. β -catenin korrelációja a miRNS expresszióval

A β -catenin immunreakciók elvégzése után a magi β -catenin expressziója inverz korrelációban állt a miR-17-5p ($p < 0,03$), miR-122 ($p < 0,003$), miR-195 ($p < 0,009$), miR-210 ($p < 0,0042$) és miR-214 ($p < 0,008$) szintekkel. Ugyanúgy inverz korrelációt kaptunk a citoplazmatikus β -catenin expresszió és miR-17-5p ($p < 0,006$), miR-122 ($p < 0,001$), miR-195

($p < 0,01$), miR-210 ($p = 0,003$) és miR-214 ($p < 0,03$) között, ugyanakkor miR-221 pozitívan korrelált ($p < 0,04$) a citoplazmatikus β -catenin expresszióval.

7. mikroRNS expresszió összehasonlítása HB-ben és HCC-ben

A miR-122, miR-195, miR-214 és miR-221 azonos irányú változást, míg a miR-17-5p és miR-210 ellentétes irányú változást mutat hepatoblastomában és HCC-ben. Viszont a miR-214 változása egy a hepatoblastomákban leírt miR-expressziót vizsgáló közleményben, az általunk vizsgált mintákban tapasztaltakkal ellentétesnek bizonyult.

ÚJ EREDMÉNYEK, KÖVETKEZTETÉSEK

1.

Elsőként mutattuk ki, hogy a **miR-18a** szignifikáns különbséget mutat az epitheliális hepatoblastoma embrionális és fetális szubtípusa között, aminek következtében a miR-18a alkalmas lehet a kevésbé differenciált embrionális szubtípus és a differenciáltabb fetális szubtípus elkülönítésére, ami prognosztikai értékű lehet. Ez a különbség, valamint a hepatoblastoma komponensek és a környező máj közötti miRNS expressziós különbségek hozzásegíthetnek a két komponensben zajló eltérő patogenetikai folyamatok megértéséhez.

2.

Kimutattuk, hogy a **magas miR-21**, valamint **alacsony miR-222 és miR-224** expressziós szint jobb teljes túléléssel társul hepatoblastomában az epitheliális komponenstől függetlenül, amely HCC-vel részben megegyező, részben különböző sajátságot mutat.

3.

A túlélésben szerepet játszó miRNS-ek *in silico* célgén-kereséseként egy egyelőre kevésbé ismert cink-ujj gént, a **ZNF207**-et kaptuk, mely fehérje expressziója a hepatoblastoma, különösen az embrionális komponens és a környező máj között bizonyult eltérőnek, a teljes túléléssel azonban nem mutatott összefüggést.

4.

A mintákon elvégzett **β -catenin** immunhisztokémiai reakciók eredményének és a mikroRNS expressziós adatok korreláltatásának eredményeként azt kaptuk, hogy a sejtmagba és citoplazmába lokalizálódó β -catenin expresszió fordított arányú korrelációt mutat a **miR-17-5p**, **miR-122**, **miR-195** és **miR-210** szintjével, ami egy β -catenin-karakterisztikus miRNS mintázatra utalhat.

5.

Két oncomiR, a **miR-17-5p** és **miR-210**, expressziójának HCC-től eltérő változása tumoros és tumor környéki máj között a hepatoblastoma HCC-től eltérő patogenezisére utalhat, ami későbbiekben akár diagnosztikai célt is szolgálhat a két tumor típus molekuláris szinten való elkülönítésében.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

Megjelent közlemények impact factora (IF): 6,179

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke (IF:5,533):

1. **Gyugos, M.,** G. Lendvai, I. Kenessey, K. Schlachter, J. Halasz, P. Nagy, M. Garami, Z. Jakab, Z. Schaff and A. Kiss. (2014) microRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. Virchows Arch. 2014 Apr; 464(4): 419-427. Doi:10.1007/s00428-014-1549-y.

IF: 2,676

2. K.Schlachter, **Gyugos, M.,** J. Halász, G. Lendvai, K. Baghy, M. Garami, B. Gyöngyösi, Z. Schaff, A. Kiss (2014) High Tricellulin expression is associated with better survival in human hepatoblastoma. Histopathology.2014 Apr 16. doi: 10.1111/his.12436.

IF: 2,857

Nem az értekezés alapjául szolgáló közlemények jegyzéke (IF: 0,646):

1. A. Dencs, A. Farkas, **M. Gyugos,** A. Kurcz, E. Puskas, B. Tresó, E. Rusvai, E. Barcsay and M. Takacs. (2011) Phylogenetic analysis of a nosocomial transmission of hepatitis B virus at a paediatric haematology ward. Acta Microbiol Immunol Hung, 58: 23-29.

IF: 0,646

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Prof. Dr. Schaff Zsuzsának** mindazért, aminek következtében ez a munka létrejöhett. Köszönöm a szakmai útmutatásait, alaposságát, türelmét és idejét, valamint a lehetőséget, hogy kutatási eredményeinket nívós nemzetközi konferenciákon is bemutathassuk. Szeretném megköszönni **Prof. Dr. Tímár Józsefnek**, hogy intézetvezetőként lehetőséget teremtett a PhD munkám kivitelezéséhez és ezzel hozzájárult szakmai fejlődésemhez. Köszönöm **Dr. Kiss András, Dr. Lendvai Gábor** és **Dr. Lotz Gábor docens** uraknak a szakmai segítségnyújtást és a tudományos közleményekben való segítséget, szeretném megköszönni alapos és kitartó munkájukat.

Köszönettel tartozom I. sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet munkatársainak, hogy létrejöhett ez a munka, hisz a mintáink egy részét ők biztosították. **Prof. Dr. Nagy Péter, Prof. Dr. Kovalszky Ilona, Dr. Baghy Kornélia.**

Hálás köszönettel tartozom a II. számú Gyerekklinika munkatársainak **Dr. Jakab Zsuzsának** és **Dr. Garami Miklós** egyetemi docens úrnak a betegadatokért. Külön köszönet illeti **Dr. Györffy Balázst**, az I. számú Gyerekklinika kutatóját, akinek alapos, precíz és gyors munkájára az *in silico* vizsgálatok során számíthattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Tőkés Anna-Máriának** a disszertációm legnagyobb alapossággal elkészített, minden apró részletre kiterjedő házi

bírálatáért. Köszönettel tartozom **Dr. Kenessey Istvánnak**, hogy segített tájékozódni a statisztika bonyolult világában és bármikor rendelkezésemre állt, ha segítségre volt szükségem. Szeretném megköszönni kolleganőmnek, **Dr. Schlachter Krisztinának** az immunreakciók kiértékelésében való segítséget. Köszönöm **Dr. Gyöngyösi Benedeknek** a statisztikával illetve a számítógépes szoftverek használatával kapcsolatos segítségét.

Hálásan köszönöm **Rigóné Kálé Elvirának** az angol nyelvű munkák lektorálását. Külön köszönet illeti az asszisztenseket, akik türelme határtalan és mindig a rendelkezésemre álltak: **Pekár Zoltánné, Horváth Csilla, Gregor Viktória, Sklánitzné Samodai Erika és Azumah Erzsébet**. Nagyon szépen köszönöm **Hegedüs Zitának és Pekár Zoltánnénak** a munkán túlmenően a barátságukat. A **II.sz. Pathológiai Intézet** minden egyes dolgozójának köszönök mindent. Végül, de nem utolsó sorban szeretnék köszönetet mondani páromnak, **Végh Árpádnak**, hogy mindvégig támogatott, biztatott, motivált és mellettem állt.